

POTENSI PENGHAMBATAN TIROSINASE EKSTRAK ETANOL DAUN TOMAT

(*Lycopersicon esculentum* Mill, var. *Pyriforme* Alef)

Afrisusnawati Rauf, Surya Ningsi, Hasmawati Nurdin

Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Alauddin Makassar

Email: afrisusnawati.rauf@uin-alauddin.ac.id

ABSTRAK

Tirosinase adalah oksidoreduktase yang sangat penting dalam pengobatan dan kosmetik karena kemampuannya menghasilkan melanin yang berperan dalam proses hiperpigmentasi. Tirosinase merupakan enzim kunci untuk biosintesis melanin, mengkatalisis oksidasi L-tirosin menjadi L-dopaquinon. Penghambatan tirosinase adalah pendekatan yang efektif untuk mengontrol hiperpigmentasi pada kulit. Tanaman tomat diketahui memiliki kandungan kimia yang cukup tinggi antara lain alkaloid, arbutin, amigdalina, dan pektin. Penelitian ini bertujuan untuk menguji aktivitas penghambatan ekstrak etanol daun tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill, var. *Pyriforme* Alef). Ekstraksi dilakukan secara maserasi dalam etanol selama 3x24 jam. Dilakukan uji identifikasi golongan senyawa alkaloid, flavonoid, glikosida, saponin, terpenoid, dan fenol. Uji penghambatan tirosinase dilakukan dengan arbutin sebagai pembanding. Hasil uji penghambatan tirosinase ekstrak etanol daun tomat menunjukkan nilai IC_{50} 78,89 $\mu\text{g/mL}$ dan IC_{50} arbutin 73,09 $\mu\text{g/mL}$.

Kata kunci : Ekstrak Etanol Daun Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill, var. *Pyriforme* Alef), tirosinase, hiperpigmentasi, melanin.

PENDAHULUAN

Melanogenesis adalah proses fisiologis dalam sintesis pigmen melanin yang bertanggungjawab terhadap pigmentasi pada kulit dan mencegah kerusakan kulit di bawah kondisi normal (Pintus & Span, 2015). Melanin adalah pigmen yang memainkan peran penting dalam perlindungan terhadap kerusakan UV dan merupakan sistem pertahanan kulit yang penting terhadap faktor-faktor berbahaya. (Petrillo et al., 2016).

Hiperpigmentasi adalah gangguan pigmen pada kulit yang paling umum. Peningkatan lokal dalam sintesis melanin atau distribusi melanin yang tidak merata dapat menyebabkan hiperpigmentasi atau bercak pada kulit. (Ozer, Mutlu, 2007). Proses pembentukan senyawa melanin (melanogenesis) terjadi dengan bantuan biokatalis terutama enzim tirosinase (Hindun et al., 2017). Tirosinase mengkatalisis langkah pertama dalam dua reaksi sintesis melanin, yaitu hidroksilasi

L-tirosin menjadi 3,4-dihidroksifenilalanin (L-dopa) dan oksidasi L-dopa menjadi dopaquinon. Dopaquinon merupakan senyawa yang sangat reaktif yang dapat mengalami polarisasi secara spontan membentuk melanin (Nguyen et al., 2016). Pembentukan melanin dapat dihambat dengan beberapa cara, diantaranya menurunkan sintesis tirosinase, menurunkan transfer tirosinase, dan menghambat aktivitas enzim tirosinase (Himawan, Ratu, 2016).

Salah satu tanaman yang telah digunakan secara empiris oleh masyarakat Sulawesi Selatan adalah daun tomat. Tanaman ini biasanya digunakan untuk mengobati luka bakar, kulit terbakar sinar matahari, radang kulit, jerawat, kurap, dan borok kronis. Salah satu kandungan kimia yang cukup tinggi dari tanaman ini adalah alkaloid, arbutin, amigdalinal, dan pektin (Dalimartha, 2007 dalam (Pratama, et al., 2011). Penelitian sebelumnya tentang aktivitas pengikatan radikal bebas DPPH, ekstrak daun tomat dinyatakan memiliki IC_{50} sebesar 88,94 ppm \pm 0,22. Dilihat dari nilai IC_{50} efek antioksidan daun tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sehingga memiliki aktivitas antioksidan kuat (Astuti, 2016; 47).

METODE PENELITIAN

Alat Penelitian. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Alat-Alat Gelas, Bejana maserasi, Cawan porselin,

Deksikator, Oven, Ph Meter, Rotary evaporator, Tabung ependorf, Timbangan Analitik, Mikro Plate Reader 96 Well, Mikro Pipet. Bahan-bahan yang digunakan adalah Air suling, Aluminium foil, Arbutin, asam asetat anhidrat (AC_2O), asam klorida (HCL) 2 N, asam sulfat pekat (H_2SO_4), besi (III) klorida ($FeCl_3$), Dimetilsulfoksida (DMSO), Ekstak etanol daun tomat, Eter, Enzim tirosinase 25 KU mushroom (sigma®), Etanol 96%, heksan, Kalium Hidroksida (KOH), Kalium Dihidrogen Pospat (KH_2PO_4), kertas perkamen, kertas saring, L-Tirosin, natrium klorida (NaCl), Magnesium, Pereaksi Dragendorf, mayer, wagner, tisu, dan Simplisia daun tomat.

Prosedur Penelitian

Ekstraksi sampel

Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi. Sampel daun tomat yang telah kering ditimbang sebanyak 250 gram dimasukkan ke dalam wadah maserasi, kemudian ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 3 Liter hingga terendam seluruhnya. Wadah maserasi ditutup dan disimpan selama 3 x 24 jam di tempat yang terlindung dari sinar matahari langsung. Selanjutnya disaring, dipisahkan antara ampas dan filtrat. Filtrat etanol yang diperoleh kemudian dikumpulkan dan diuapkan dengan *rotary evaporator* dengan suhu 60°C sampai diperoleh ekstrak etanol kental.

Uji Kadar Air Simplisia

Cawan penguap dikeringkan pada suhu 105° selama 30 menit kemudian

didinginkan dalam eksikator \pm 15 menit lalu ditimbang. Sebanyak 3 gram sampel dimasukkan ke dalam cawan penguap didinginkan di eksikator lalu ditimbang. Prosedur ini dilakukan berulang hingga diperoleh bobot tetap. Kadar air sampel ditentukan dengan persamaan.

$$\% \text{ Kadar Air} = x \times 100\%$$

Dengan : $X = \text{Bobot sampel awal (g)}$

$$x_1 = \text{Bobot cawan + sampel}$$

(sebelum

pemanasan) (g)

$$y = \text{Bobot cawan + sampel}$$

(setelah

pemanasan) (g)

Identifikasi golongan senyawa

Alkaloid. Ekstrak etanol daun tomat 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 2 ml HCl 2N kemudian dipanaskan selama 2-3 menit, didinginkan dan ditambahkan NaCl kemudian disaring. Ditambahkan 2 ml HCl 2N ke dalam filtrat. Dibagi menjadi 3 bagian dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi (I) ditambahkan dragendorf menghasilkan endapan merah jingga, tabung reaksi (II) ditambahkan mayer menghasilkan endapan putih kekuningan, dan tabung reaksi (III) ditambahkan wagner menghasilkan endapan coklat.

Flavonoid. Ekstrak etanol daun tomat 0,5 g ditambahkan aquades dan heksan lalu dikocok. Kemudian akan terpisah menjadi 2 lapisan dimana ekstrak etanol dalam air akan berada dibawah dan lapisan heksan akan berada di atas.

Lapisan heksan dipisahkan sementara lapisan air ditambahkan etanol kemudian dipisahkan menjadi 2 bagian. Bagian pertama ditambahkan 0,5 ml HCl pekat, kemudian dipanaskan di atas penangas selama 15 menit. Positif bila berwarna merah terang atau violet. Bagian kedua ditambahkan 0,5 ml HCl pekat kemudian ditambahkan 3-4 potong magnesium, amati perubahan warna yang terjadi pada tiap lapisan. Jika warna merah berarti positif mengandung flavonoid. Merah pucat- merah tua mengandung flavon.

Glikosida. Ekstrak etanol daun tomat 0,2 g diuapkan di atas penangas air, lalu ditambahkan 3 ml asam asetat dengan sedemikian pemanasan, kemudian didinginkan. Selanjutnya, larutan ini ditambah larutan besi (III) klorida 0,3M, lalu dengan hati-hati ditambahkan campuran 3 ml asam sulfat dan 1 tetes besi (III) klorida 0,3M sehingga akan terbentuk cincin warna merah coklat pada batas cairan. Setelah beberapa menit di atas cincin akan berwarna biru hijau, ini menunjukkan adanya glikosida dan glikon gula 2-deoksi (Hanani, 2015).

Saponin. Ekstrak etanol daun tomat sebanyak 0,5 g ditambahkan 10 ml air panas kemudian didinginkan, selama 10 detik larutan dikocok dengan kuat kemudian didiamkan selama 10 detik. Terbentuk buih setinggi 1-10 cm dan buih tidak hilang bahkan setelah penambahan 1 tetes HCl 2N jika ekstrak positif mengandung saponin (Ditjen POM, 1995).

Terpenoid. Ekstrak etanol daun tomat sebanyak 0,5 g ditambah 5 ml larutan eter kemudian diuapkan. Selanjutnya ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat ke dalam residu, asam sulfat pekat 1 tetes. Ketika filtrate menghasilkan warna merah-hijau atau violet-biru maka ekstrak positif mengandung terpen (Hanani, 2015).

Fenol. Ekstrak etanol daun tomat 0,2 gram ditambahkan dengan larutan FeCl₃ 1%. Hasil ditunjukkan dengan terbentuknya warna hijau, merah, ungu, biru tua, biru, biru kehitaman, atau hijau kehitaman (Harborne, 1987).

Penentuan aktivitas penghambatan tirosinase

Uji penghambatan aktivitas enzim tirosinase berdasarkan metode Miyazawa dan Tamura (2007) dengan modifikasi tertentu. Sebanyak 50 µl L-Tirosin 1 mM, 50 µl larutan dapar fosfat 50 mM (pH 6,8), 20 µl larutan enzim tirosinase dan 100 µl larutan sampel dimasukkan ke dalam sumuran pada *microplate*. Campuran tersebut diinkubasi selama 5 menit pada suhu kamar, kemudian diukur serapannya menggunakan *microplate reader* (ELISA) pada panjang gelombang 490 nm. Dilakukan pengujian blanko tanpa penambahan enzim yaitu digunakan Sebanyak 170 µl larutan dapar fosfat (pH 6,8), 50 µl L-Tirosin 1 mM. Kontrol negatif menggunakan campuran tersebut diatas tanpa penambahan sampel dan untuk kontrol positif menggunakan arbutin sebagai pengganti sampel. Langkah-

langkah tersebut diatas dilakukan secara triplo. (Miyazawa, Tamura 2007)

Penentuan persentase penghambatan aktivitas tirosinase berdasarkan rumus :

% penghambatan Tirosinase =

Keterangan :

A = Absorbansi sampel tanpa penambahan inhibitor.

B = Absorbansi sampel dengan penambahan inhibitor.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Tabel 1. Hasil Ekstraksi Daun Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill, var. Pyriforme Alef) dengan Metode Maserasi

Berat Sampel	Berat Simplisia yang diekstraksi	Berat Ekstrak	Persen (%) Rendamen
2 kg daun tomat	250 gram	6,7 gram	5,68 %

Tabel 2. Hasil Uji Kadar Air Simplisia Daun Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill, var. Pyriforme Alef) dengan Metode Gravimetric

Parameter Pengukuran	Hasil
Kadar Air	3, 94 %

Tabel 3. Hasil Identifikasi Golongan Senyawa Ekstrak Etanol Daun Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill, var. Pyriforme Alef)

Golongan Senyawa	Ekstrak Etanol Daun Tomat (<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill, var. Pyriforme Alef)
Alkaloid	-
Flavonoid	+
Glikosida	+
Saponin	+
Terpenoid	+
Fenol	+

Keterangan :

(+) Terdapat golongan senyawa

(-) Tidak terdapat golongan senyawa

Melanin bertanggungjawab terhadap warna dan kulit dan berperan penting dalam perlindungan terhadap sinar UV penyebab kerusakan kulit. (Chang, 2012). Melanin merupakan pigmen utama pada warna kulit, rambut dan mata. Melanin dapat terbentuk secara berlebihan ketika terkena paparan matahari kronis, melasma atau penyakit hiperpigmentasi lainnya (Briganti et al. 2003).

Adanya penghambat tirosinase akan menghambat reaksi pencoklatan atau pembentukan melanin. Berbagai inhibitor tirosinase telah banyak ditemukan dalam bahan kosmetik sebagai pencegah hiperpigmentasi, diantaranya adalah *asam askorbat*, *arbutin*, *cojic acid*, *merkuri* dan *hidrokuinon*. Dari beberapa senyawa tersebut, *cojic acid* memiliki efek inhibisi dan kestabilan paling besar dalam produk kosmetik, namun *cojic acid* bersifat karsinogenik (Mizawa, Tamura, 2007 dalam Supriyanti, 2010).

Pengujian penghambatan tirosinase dilakukan dengan menggunakan instrumen *microplate reader* (ELISA) dan enzim tirosinase yang disintesis dari jamur dan L-tirosin sebagai substrat. Kerja maksimum enzim tirosinase pada pH 6,8 sehingga didapar dengan dapar fosfat pH 6,8 yang telah didinginkan. Enzim tirosinase juga stabil pada suhu -20°C sehingga dalam

penyimpanan dan proses pengerjaan enzim harus tetap berada pada wadah dingin.

Prinsip pengukuran yaitu enzim tirosinase akan mengkatalis pembentukan L-tirosin menjadi L-DOPA kemudian terbentuk dopakrom yang dapat terukur intensitasnya pada panjang gelombang 490 nm. Dopakrom yang terbentuk akan terlihat dengan adanya warna ungu muda. Penambahan sampel bertujuan untuk menghambat aktivitas enzim tirosinase sehingga jumlah dopakrom yang terbentuk semakin berkurang. Serapan yang diperoleh (absorbansi) digunakan untuk mengetahui aktivitas ekstrak dalam menghambat reaksi tirosin-tirosinase. Penghambatan aktivitas enzim tirosinase ditunjukkan dengan nilai IC_{50} . IC_{50} merupakan nilai konsentrasi penghambatan tirosinase yang dapat menghambat 50% aktivitas tirosinase.

Penghambatan terhadap aktivitas tirosinase dalam reaksi tirosin-tirosinase mempunyai arti penting karena dapat menghambat pembentukan melanin.

Tabel 3. Hasil Persen Penghambatan Ekstrak Etanol Daun Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill, var. *Pyriforme Alef*)

Sampel	Konsentrasi	Persen (%) Inhibitor
Ekstrak Daun Tomat	10 ppm	14,432 %
	15 ppm	18,556 %
	20 ppm	26,804 %
	25 ppm	31,958 %
	50 ppm	34,020 %
Arbutin	10 ppm	14,432 %
	15 ppm	15,463 %
	20 ppm	20,618 %
	25 ppm	32,989 %

50 ppm	35,051 %
--------	----------

Tabel 5. Hasil Nilai IC₅₀ Ekstrak Etanol Daun Tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill, var. Pyriforme Alef)

Sampel	Nilai IC ₅₀ (µg/mL)
Ekstrak Daun Tomat	78,89
Arbutin	73,09

Hasil dari nilai IC₅₀ dari sampel sebesar 78,89 µg/mL dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun tomat tergolong aktif sebagai inhibitor tirosinase. Menurut Miyazawa et al. (2007), sampel tergolong aktif sebagai inhibitor tirosinase dengan jika memiliki nilai IC₅₀ <1000 ppm. Namun aktivitas penghambatan tirosinase masih lebih rendah dibanding arbutin sebagai kontrol positif yaitu nilai IC₅₀ sebesar 73,09 µg/mL. Dari hasil yang diperoleh nilai IC₅₀ ekstrak etanol daun tomat dan IC₅₀ kontrol positif tidak jauh berbeda yaitu 78,89 µg/mL dan 73,09 µg/mL yang masing-masing dapat dikategorikan aktif sebagai penghambat tirosinase.

KESIMPULAN

1. Ekstrak daun tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill, var. Pyriforme Alef) memiliki potensi sebagai penghambat tirosinase.
2. Ekstrak daun tomat (*Lycopersicon esculentum* Mill, var. Pyriforme Alef) memiliki nilai IC₅₀ 78,89 µg/mL yang dibandingkan dengan nilai IC₅₀ arbutin sebagai kontrol positif sebesar 73,09 µg/mL.

DAFTAR PUSTAKA

- Astuti, Sari. 2016. Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Kloroform Daun Tomat (*Solanum Lycopersicum* L.), Daun Cabai Merah (*Capsicum Annum* L.) Dan Daun Ciplukan (*Physalis Angulata* L.) Dengan Metode DPPH. *Skripsi*. Universitas Sebelas Maret.
- Briganti, S., Camera, E., Picardo, M., 2003. Chemical and instrumental Approaches to treat hyperpigmentation, *Pigment Cell Res.*16. 101-110.
- Chang, T. (2012). Biotransformation Tyrosinase and Tyrosinase Inhibitors, 1–2. *J Biocatal Biotransformation*. 1:2
- Dalilmartha, S. 2007. *Atlas tumbuhan obat indonesia*. Jakarta: Puspa Swara.
- Ditjen POM. *Farmakope Indonesia Edisi IV*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. 1995.
- Ditjen POM. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jakarta: Departemen Kesehatan RI, 2000.
- Pratama, Baits. (2011). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Tomat Buah (*lycopersicon esculentum* mill, var. Pyriforme alef) dan Daun Tomat Sayu r (*Lycopersicon esculentum* mill, var. Commune bailey) dengan Metode DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil). *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. Vol 2 No. 1
- Hanani, Endang. 2015. *Analisis Fitokimia*. Jakarta: EGC.
- Harborne. 1987. *Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*, diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata & Iwang Soediro. Terbitan kedua. Bandung: Penerbit ITB.
- Himawan, Ratu. (2016). Uji Aktivitas Ekstrak Etanol 70% dan Etil Asetat Daun Sukun (*Artocarpus altilis* (Park.) Fosberg) sebagai Inhibitor Tirosinase. *Jurnal Farmamedika* Vol. 1, No. 2.
- Hindun, Rusdiana. (2017). Potensi Limbah Kulit Jeruk Nipis (*Citrus Auronfolia*) sebagai Inhibitor Tirosinase. 4, 64–69. *IJPST Volume 4, Nomor 2*.
- Miyazawa, Tamura. (2007). Inhibitory

- Compound of Tyrosinase Activity from the Sprout of *Polygonum hydropiper* L. (Benitade). *Biol. Pharm. Bull.* 30(3) 595—597
- Nguyen. (2016). Tyrosinase inhibitory activity of flavonoids from *Artocarpus heterophyllous*. *Chemistry Central Journal*, 4–9.
- Ozer. (2007). Antityrosinase Activity of Some Plant Extracts and Formulations Containing Antityrosinase Activity of Some Plant Extracts and Formulations Containing Ellagic Acid, *Pharmaceutical Biology*. Vol. 45 No. 6.
- Petrillo, A. Di, González-paramás, A. M., Era, B., Medda, R., Pintus, F., Santos-buelga, C., & Fais, A. (2016). Tyrosinase inhibition and antioxidant properties of *Asphodelus microcarpus* extracts. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 1–9.
- Pintus, F., & Span, D. (2015). Antityrosinase activity of *Euphorbia characias* extracts,. *Peerj*.1305.
- Supriyanti Florentina, M. T and Seviana, W. 2010. Studi Inhibisi ekstrak metanol kulit batang *Artocarpus* Sp dalam mencegah hiperpigmentasi kulit. *Jurnal Pengajaran MIPA*, Universitas Pendidikan Indonesia. 13 (1).